

# Serodiagnosis of Lyme borreliosis : in search of the holy grail

Citation for published version (APA):

Goossens, H. A. T. (2002). *Serodiagnosis of Lyme borreliosis : in search of the holy grail*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Unigraphics. <https://doi.org/10.26481/dis.20021211hg>

## Document status and date:

Published: 01/01/2002

## DOI:

[10.26481/dis.20021211hg](https://doi.org/10.26481/dis.20021211hg)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Summary

Lyme borreliosis (LB) is an infectious disease that is caused by the bacterium *B. burgdorferi* and affects humans and domestic animals. The causative organism belongs to the *Spirochaetaceae*, a family of relatively long, slender, helically shaped bacteria and is transmitted via the bite of ticks of the genus *Ixodes*, who are found in all parts of the world with a temperate climate. In some parts of the USA more than 50% of the *Ixodes scapularis* ticks have been shown to be infected with *B. burgdorferi*. These ticks transmit *B. burgdorferi* among wildlife, that forms the main reservoir. Therefore LB is a zoonosis. Mice are the main hosts for *Ixodes* ticks and are also the main reservoir of *B. burgdorferi*. The wood-mouse *Apodemus sylvaticus* and the bank vole *Clethrionomys glareolus* are probably the most important reservoir of *B. burgdorferi* in Belgium and the Netherlands and the sheep tick *Ixodes ricinus* the most important vector. In Europe a reservoir function for approximately 40 mammals and birds has been established and infection rates of *I. ricinus* ticks ranged from 5% to 34% for nymphs and from 11% to 34% for adult ticks. The risk of acquiring clinical LB after the bite of an infected tick has been estimated to be 1-4%.

Infections with *B. burgdorferi* might result in a plethora of symptoms involving several organ systems. Despite the fact that most of the symptoms of LB have been known, and some associated with tick bites in Europe for more than a century, it was not until 1981 that in the USA the causative organism was isolated, cultured and shown to be the etiological agent. In 1992, *B. burgdorferi* sensu lato has been split up into several genomic species of which *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* and *B. afzelii* are associated with clinical disease. In Europe all this three genomic species are endemic, but in the USA *B. burgdorferi* sensu stricto is the only species found so far. There are indications that the different genomic species account for differences in the clinical course of an infection. *B. afzelii* has been associated with cutaneous disorders, *B. garinii* with neurological symptoms and *B. burgdorferi* sensu stricto with arthritis, what is indemick in the USA, apart from erythema migrans, the most pathognomonic symptom of LB. Neurological symptoms of LB are rarely seen in the USA.

In humans, an early and a late stage of LB can be

recognised. The early stage consists of a localised infection of the skin with as most typical clinical symptom a ring-shaped and usually peripherally expanding rash with central clearing: erythema migrans. This rash occurs at the site of the tick bite and might be followed by a disseminated infection. During the early LB (ELB) numerous spirochetes can be found at the site of the lesion or in case of disseminated ELB in the blood. General malaise and fever might be the only symptoms of disseminated ELB. Arthralgia and myalgia, which are typical intermittent, are the most frequently seen rheumatological symptoms of LB and lymphadenitis benigna cutis is a cutaneous manifestation that is mainly seen in children. Furthermore, there is a broad range of neurological symptoms associated with early disseminated LB of which meningoradiculoneuritis (Bannwarth's syndrome) is the most frequently occurring. Cardiac involvement is less common and the most common abnormalities are rhythm and conduction disturbances.

Late LB (LLB) marks a persistent infection and may occur month to years after the primary infection. Very few spirochetes are present in the lesions and the disease symptoms might be caused by an (over)reaction of the host. Late Lyme arthritis is typically mono- or oligoarticular and mainly affects large joints, especially the knees. Acrodermatitis chronica atrophicans a late skin disorder of LB, is characterised by atrophy of the skin especially at the site of the causative tick bite.

The clinical symptoms of LB in domestic animals are less well defined. With exception of the cutaneous lesions all other symptoms found in man, have been described in animals with in addition glomerulonephritis and abortion. Lameness combined with malaise is, however, the most important described symptom in animals.

Laboratory methods for the diagnosis of LB either intend to isolate or detect the presence of the causative micro-organism or to measure a specific immune response against it. Detection of *B. burgdorferi* is possible by means of direct microscopy, antigen detection, isolation and molecular microbiological methods e.g. PCR. However, these methods are not (yet) useful in routine clinical practice because they have a too low sensitivity,

are laborious and time consuming, require tissue biopsies and/or are not commercially available.

Therefore, at present measuring antibodies against *B. burgdorferi* is the most used method for laboratory confirmation of a clinical diagnosis of LB. However, several problems are encountered with Lyme serology. The antibody response to *B. burgdorferi* is variable, sometimes even absent, and slow. The primary immune response is directed against the 41 kD flagellin protein. In the course of the infection, antibodies against a broad range of other *B. burgdorferi* proteins either specific or non specific are produced. IgM antibodies may not appear until 6 weeks after infection and IgG antibodies may not peak before the onset of the disease and may persist for years, at least in humans. Apart from LB patients that do not develop any measurable antibody response to LB, effective antibiotic therapy early in the course of an infection may prevent a humoral immune response. False positive results can be due to cross-reactivity of *B. burgdorferi* with other bacteria, mainly other *Borrelia* spp., treponemata, viruses or auto-immune diseases. In addition, a large number of people and animals have (had) asymptomatic *B. burgdorferi* infections causing "false" positive results. This is common especially in humans and animals that are regularly exposed to ticks.

The most commonly used serological tests for LB are the immunofluorescent antibody assay (IFA), enzyme immunoassay (EIA) and Western immunoblot (WB). An indirect haemagglutination assay (IHA) has also been developed and marketed, but has never been widely used. IFA has the advantage that, when performed by experienced personnel, false positive results may be distinguished because of an abnormal fluorescence pattern. Testing of large numbers of samples is, however, time consuming and tiring. With EIA, large numbers of samples can be handled and the results read colorimetrically which not only circumvents the problem of subjectivity, but also made automation of the test feasible. This is important especially when large numbers of samples have to be tested for epidemiological surveys. To increase specificity and sensitivity of EIA and IFA, pre-adsorption of serum samples and/or use of selected enriched and/or purified antigens is being practised. WB has the theoretical advantage of detecting antibodies against individual and specific *B. burgdorferi* proteins. It is however a more complicated test and therefore only recommended as an additional test for samples that are positive in an EIA test to increase specificity without loss of sensitivity.

The main problems with all immunoassays for LB

is lack of standardisation and the heterogeneity of the genospecies complex of *B. burgdorferi* and the variability of immune response among infected individuals. Moreover, as these tests cannot differentiate between active disease, recovery and subclinical infections, false positive and false negative results occur. The predictive accuracy of a positive or negative serological result depends on the pre-test likelihood of LB being present. Therefore requests for LB immunoassays should only be made to confirm LB diagnosis in cases of clinical and epidemiological evidence.

The diagnosis of LB in animals is even more difficult than in humans. Animals lack a pathognomonic marker like EM in human LB. In man, isolation of *B. burgdorferi* from a skin biopsy of this skin lesion is considered as the "golden standard". Asymptomatic infections seem to be even more common in animals. Not only high incidences of seropositivity in healthy animals from endemic areas have been reported, but also the causative micro-organism *B. burgdorferi* itself has been isolated from healthy dogs. However, only in animals living in LB endemic regions, sero-positivity is found.

In **chapter II** a summary is presented of the literature published between 1990-2002 concerning the performance of EIA- and WB-tests for the laboratory confirmation of the clinical diagnosis of LB in humans. In total 59 articles are listed. In addition, the information on test characteristics and determination of test performance were evaluated. To estimate the methodological quality of testing, a scoring method was developed for ranking the literature. Various factors were taken into account: the type of antigen(s) used, description of how the tests were performed, the method(s) of performance evaluation, the choice of composition and numbers of positive and negative control sera including the applied clinical definitions. The total score was subdivided into 6 scoring groups. The systematic evaluation of the performance testing of serodiagnostic test for LB in humans shows clearly that the choice and number of patient groups and control groups is not a reflection of the real laboratory situation. In future studies, the expansion of the non-Lyme patient control group could help the design of better evaluations and the ability to perform a meta-analysis on the accuracy of these diagnostic tests.

In **chapter III** the the performance of 11 commercially available EIAs and four WB tests for the detection of IgM and IgG antibodies against *B. burgdorferi* were compared. A total of 229 serum specimens were used:

## SUMMARY

26 from patients with ELB, 13 from patients with LLB, 62 from healthy controls and 128 from patients with disorders clinically mimicking LB and/or known to cause cross-reactivity in LB serological tests (patient control group). In specimens from patients with ELB, the sensitivity of the individual tests ranged from 35% to 81% for detection of IgM. In LLB, sensitivity of the tests ranged from 46% to 92%. In healthy controls the specificity of the tests ranged from 89% to 100% and from 82% to 97% for IgM and IgG tests, respectively. In the patient control group, specificity of the tests ranged from 75% to 90% for IgM and from 84% to 100% for IgG. The Behring (Germany) and Genzyme Virotech (Germany) IgM-EIAs showed the best performance in detecting ELB. For the detection of LLB, the Dako (Denmark) IgG test was the best despite its low sensitivity. The maximum sensitivity of Western blotting for detecting IgM in patients with ELB and IgG in patients with LLB was 50% and 46%, respectively.

When the use of an EIA-WB two-test protocol was applied, an improvement of the specificity and positive predictive values of the EIA results were observed. However, the use of the EIA-WB two-test protocol also caused a significant loss in sensitivity. Patients with Epstein-Barr virus or cytomegalovirus infections who had a positive reaction in the IgM-EIA could not be discriminated from patients with ELB with WB. Hence, positive and negative predictive values in combination with sensitivity and specificity indicated that the exclusion of these infections was more relevant than the confirmation of a positive IgM-EIA with WB.

Furthermore, some laboratories prefer polyvalent EIAs or routinely use IgM- and IgG-EIAs regardless of the stage of the disease or the clinical symptoms observed. Therefore, the performance of combined IgM and IgG testing in our serum pannel was evaluated. The only polyvalent EIA that was tested in chapter II performed poorly in comparison with the monovalent assays. The use of combined IgM and IgG testing significantly improved the sensitivity but, due to cross-reacting IgG and IgM antibodies (mostly non-paired), a significant decrease in specificity was found when compared to IgM and IgG test results.

In chapter IV the prevalence of IgA, IgM, total IgG and subclasses IgG<sub>1-4</sub> antibodies against *B. burgdorferi* was examined by WB. The sera of 40 ELB patients, 27 LLB patients, 62 healthy controls and 140 non-LB patients were used. Detection of IgG<sub>1</sub> versus total IgG showed to be more sensitive in detecting *B. burgdorferi* antigens,

especially flagellin (41 kD) protein, but did not improve the performance of WB. The use of IgG<sub>1</sub> detection showed an increase in sensitivity and specificity for the ELB patient group compared to the standard IgG and IgM detection method by enzyme immunoassays using purified *B. burgdorferi* flagellum antigen. However, in an enzyme immunoassay using a total sonicate, sensitivity in detecting ELB and LLB with IgG<sub>1</sub> remained lower compared to the detection of ELB by IgM antibodies and LLB by total IgG antibodies. It was concluded that only the use of purified flagella in combination with IgG<sub>1</sub> detection might enhance the performance of EIAs for the detection of LB in ELB patients.

In chapter V the risk of outdoor activity and dog ownership for acquiring LB, the dynamics of antibody response in humans and dogs and the validity of dogs as sentinel animals for the risk at LB in humans was studied. Serum samples from hunters (n=440), their working dogs (n=448) and hunters without a dog (n=53) were collected in the Netherlands at hunting dog trials and tested for antibodies against *B. burgdorferi* with a whole-cell EIA. Additionally, 75 healthy city pet dogs were tested. Results of this study indicate that the seroprevalence among active hunting dogs (18%) was in the same size of order as the seroprevalence in pet dogs (17%) and in hunters (15%). Seropositivity of a dog was not a significant indicator of increased risk of LB infection for their owners. No significant rise in seroprevalence was found in dogs older than 24 months. This indicated that seropositivity after an infection with *B. burgdorferi* in dogs is rather short, approximately one year. In humans this is considerably longer but also not life long. Therefore the incidence of *B. burgdorferi* infections in dogs was larger than in hunters, despite a similar prevalence of seropositivity in hunters and their dogs. Because no positive correlation was observed between seropositivity of the hunter and seropositivity of his dog, direct transfer of ticks between dog and hunter does not seem important and owning a dog should not be considered a risk for LB.

In chapter VI five serological tests for the detection of IgM and IgG antibodies against *B. burgdorferi* *sensu stricto* were compared in 1177 sera from Dutch dogs: 401 healthy hunting dogs, 100 healthy city dogs, 629 city dogs with various clinical symptoms and 47 huntingdogs with lameness. The results of the in-house species independent EIA (i.e. an EIA which can be used to test serum samples from different animal species) showed a strong agreement (kappa: 0.78-0.81) with the



experimental and commercially available EIA (Genzyme-Virotech, Germany) for the detection of canine IgG antibodies to *B. burgdorferi* and could be very useful in seroepidemiological studies for detecting antibodies in various animal species. Furthermore, sensitivity of the in-house EIAs for the detection of antibodies against *B. burgdorferi* showed to be independent of the antigen used. Serological diagnosis of LB in Dutch dogs with lameness (n=60), neurological (n=60) and skin disorders (n=52) was not affected by the antigenic heterogeneity. The IHA (Diagast®, France) proved to be an interesting tool for the detection of an acute Lyme infection in dogs because of its high sensitivity for IgM antibodies. Dog sera with a high IgM response against *B. burgdorferi* were identified in 96% of the cases by the IHA. However, in this study a positive serological result could not be linked to any clinical symptom that has been related to Lyme disease; neither for dogs at high or low risk of a *B. burgdorferi* infection. Therefore the use of serodiagnostic tests to support the clinical diagnosis of Lyme disease in dogs might be of limited value. Nevertheless the species independent EIA could be valuable in seroepidemiological studies where sera of several different animal species must be tested. Compared to the IgM-EIAs, the IHA showed a higher sensitivity and a better performance in detecting IgM antibodies. This might also be expected in human serum samples and warrants further research with sera of ELB patients.

In **chapter VII** the prevalence of antibodies to *B. burgdorferi* in sera of 1052 healthy persons, 1177 dogs, 3919 dairy cows and 2288 sheep from 12 regions of the Netherlands was investigated. The results showed that in all regions of the Netherlands, humans and animals are exposed to *B. burgdorferi*-infections and are therefore at risk to develop LB. In the western regions, healthy persons showed a higher prevalence (13%-17%) compared to the eastern regions (2%-6%) of the Netherlands. The prevalence found in dogs did not differ significantly within the regions studied (15%-23%). Cattle showed the highest prevalence in the eastern regions (11%-20%) and lowest in the western regions (2%-8%). Sheep showed the highest prevalence in the western regions (15-17%), whereas unexpectedly in the eastern regions the prevalence (4%-8%) was significantly lower ( $P < 0.001$ ).

The differences found in the prevalence of the antibodies against *B. burgdorferi* between the regions examined, could be explained by the differences in biotopes that are favorable for *Ixodes ricinus* ticks and the frequencies by

which humans, dogs, cattle and sheep come into contact with these biotopes.

## IN CONCLUSION

A sensitivity and specificity of 100% will never be reached for any serological test for LB. The fact that in some LB patients a specific antibody response is lacking and asymptomatic infections and cross-reacting antibodies can occur, makes the development of new tests very hard if not impossible. Still, other laboratory tests might be made commercially available, but these are likely to be more costly and laborious. Therefore, at this time and in the near future, the EIA remains the most important test for the laboratory confirmation of the clinical diagnosis of LB. In addition the EIA is an important tool for the study of the epidemiology of *B. burgdorferi* infections.

In our hands confirmation of a positive EIA test result by WB did not improve the overall results. However for the detection of IgM antibodies in ELB patients, IHA might be another valuable test, as was proven in dogs. Still, its value for the laboratory confirmation of ELB in humans has still to be elucidated.

Despite the observed high prevalence and incidence of *B. burgdorferi* infections in dogs, clinical LB in dogs seems to be very rare. In human medicine, clinicians should also be aware that the diagnosis LB is primary made on clinical symptoms and that laboratory testing is only recommended in patients whose pretest probability of LB is  $\geq 0.20$ . If the pretest probability is less, testing will result in more false positive than true positive results.





## Samenvatting

Lyme borreliose (LB) is een infectieziekte bij mens en dier veroorzaakt door de bacterie *Borrelia burgdorferi*. Deze bacterie behoort tot de *Spirochaetaceae*, een familie van lange slanke spiraalvormige bacteriën, die overgedragen worden via de beet van harde teken behorende tot het genus *Ixodes*. Deze teken komen in alle delen van de wereld met een gematigd klimaat voor. LB is een zoönose. Muizen vormen het hoofdreservoir van *B. burgdorferi* en zijn bovendien de belangrijkste gastheren voor *Ixodes* teken. In België en Nederland is de schapenteek *Ixodes ricinus* de belangrijkste vector van *B. burgdorferi* en vormen de bosmuis *Apodemus sylvaticus* en de rosse woelmuis *Clethrionomys glareolus* het belangrijkste reservoir. In sommige delen van de USA komt het voor dat meer dan 50% van de *Ixodes scapularis* teken besmet zijn met *B. burgdorferi*. In Europa varieert de besmettingsgraad van nimfen tussen de 5% en 34% en van volwassen teken tussen de 11% en 34%. Verder is aangetoond dat meer dan 40 verschillende vogel- en zoogdiersoorten symptoomloos drager kunnen zijn van *B. burgdorferi*. Het risico voor de mens op LB na een tekenbeet wordt geschat op 1% tot 4%.

Een infectie met *B. burgdorferi* kan resulteren in een breed scala van symptomen. Dit veelvoud aan symptomatologie wordt veroorzaakt door het infecterende genospecies, de weerstand van de gastheer, het stadium van de ziekte en het aangetaste orgaansysteem. De meeste ziektebeelden van LB waren in het begin van de vorige eeuw al in Europa bekend en enkele werden geassocieerd met tekenbeten. Toch heeft het tot 1981 geduurd voordat de oorzakelijke bacterie van LB werd geïsoleerd. In 1992 is deze bacterie met de species naam *B. burgdorferi* sensu lato opgesplitst in verschillende genospecies.

*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, en *B. afzelii* zijn de pathogene genospecies, en zijn in Europa endemisch. Infecties door deze drie genospecies veroorzaken koorts, algehele malaise en erythema migrans (EM). Ze worden daarnaast met verschillende klinische symptomen geassocieerd: *B. afzelii* met huidaandoeningen in het late stadium van de ziekte, *B. garinii* met neurologische afwijkingen en *B. burgdorferi* sensu stricto met artritis. In de USA, waar alleen *B. burgdorferi* sensu stricto voorkomt, zijn dan ook EM

en artritis de meest voorkomende ziektebeelden. Neurologische symptomen en acrodermatitis atroficans worden zelden gezien in de USA.

Bij LB bij de mens wordt een vroeg en een laat stadium van de ziekte onderscheiden.

Het vroege stadium bestaat uit een gelokaliseerde infectie van de huid met als meest typisch klinisch symptoom een ringvormige erythematuze laesie, die zich cirkelvormig uitbreidt en centraal opheldert: EM. Gedurende het vroege stadium van LB kunnen talrijke spirocheten op de plaats van de huiduitslag en in geval van een systemische infectie in het bloed aangetoond worden. Deze huiduitslag die ontstaat op de plaats van de tekenbeet geneest veelal spontaan, maar kan ook gevolgd worden door een systemische infectie met griepachtige symptomen zoals algemene malaise met koorts en soms spier- en gewrichtspijnen. Typisch is dat deze arthralgieën en myalgieën intermitterend voorkomen en dat verschillende gewrichten aangetast kunnen worden. Een andere huidafwijking bij LB: lymphadenitis benigna cutis, komt voornamelijk voor bij kinderen. Het meest frequent voorkomende neurologische symptoom, geassocieerd met het vroege stadium van een gedissemineerde LB, is meningoradiculoneuritis (Bannwarth's syndrome). Myocarditis met ritme- en geleidingsstoornissen als gevolg van een *B. burgdorferi* infectie wordt zelden gezien.

Het late stadium van LB wordt veroorzaakt door een persisterende infectie met *B. burgdorferi*. Symptomen kunnen pas maanden tot zelfs jaren na de primaire infectie optreden. In het late stadium worden weinig spirocheten in de aangetaste orgaansystemen gevonden en de symptomen worden waarschijnlijk veroorzaakt door een overreactie van het afweersysteem. Late Lyme artritis is typisch mono- of oligoarticulair en betreft vooral de grote gewrichten, in het bijzonder de knie. Acrodermatitis chronica atrophicans is een late manifestatie van LB en wordt gekenmerkt door atrofie van de huid in het gebied van de oorzakelijke tekenbeet.

De klinische symptomen van LB bij huisdieren zijn minder duidelijk gedefinieerd. Met uitzondering van huidlaesies zijn alle andere bij de mens voorkomende symptomen ook bij dieren beschreven met als aanvulling



glomerulonephritis en abortus. Kreupelheid in combinatie met malaise is echter het meest beschreven symptoom bij dieren.

De meest gebruikte laboratorium methoden voor LB diagnose berusten op het isoleren of aantonen van de verwekker of het meten van een specifieke immuunrespons gericht tegen *B. burgdorferi*. De detectie van *B. burgdorferi* is mogelijk door middel van microscopie, het aantonen van specifieke antigenen, isolatie of met behulp van moleculair microbiologische methoden zoals de polymerase chain reactie (PCR). Deze methoden worden echter niet routinematig gebruikt. De redenen hiervoor zijn de lage sensitiviteit en/of grote bewerkelijkheid gepaard met een lange analysetijd. Bovendien zijn weefselbiopten nodig en zijn geen commerciële testkits beschikbaar. Ondanks dat LB serologie een aantal problemen kent is het aantonen van antilichamen tegen *B. burgdorferi* de meest gebruikte laboratorium methode voor de bevestiging van een klinische diagnose van LB.

Een belangrijk gegeven is dat de ontwikkeling van antistoffen tegen *B. burgdorferi* traag kan verlopen en soms geheel kan ontbreken. De eerste antilichamen zijn meestal gericht tegen het 41 kD flagelline eiwit. Later in het verloop van de infectie worden antilichamen gevormd die gericht zijn tegen een groot aantal zowel specifieke als aspecifieke eiwitten van *B. burgdorferi*. Een IgM respons blijft bij mensen soms uit tot 6 weken na infectie, terwijl IgG antilichamen vaak pas aangetoond kunnen worden als de patient al enige tijd ziek is. Ze kunnen echter jarenlang na herstel persisteren. Een effectieve behandeling met antibiotica in het vroege stadium van de ziekte kan de immuunrespons afbreken en antilichaamvorming voorkomen. Fout positieve test resultaten komen voor als gevolg van kruisreactiviteit met andere bacteriën, hoofdzakelijk andere *Borrelia* spp., treponemata maar ook door virus-infecties of autoimmuun ziekten. Daarnaast kunnen ook bij mensen en dieren die eerder een asymptomatische *B. burgdorferi* infectie hebben doorgemaakt, antilichamen tegen *B. burgdorferi* aangetoond worden terwijl ze niet aan LB lijden. Dit komt vooral voor in populaties van mensen en dieren, die regelmatig met teken in contact komen.

De meest gebruikelijke serologische testen voor LB zijn de immunofluorescent antibody assay (IFA), de enzyme immunoassay (EIA) en de Western immunoblot (WB). De indirect haemagglutination assay (IHA) wordt weinig gebruikt. De IFA heeft het voordeel, indien uitgevoerd door ervaren personeel, dat fout positieve resultaten herkend kunnen worden aan de hand van een afwijkend

fluorescentie patroon. De test is echter tijdrovend en vooral het correct aflezen van de fluorescentie is bij grote aantallen sera erg bewerkelijk en belastend voor laboratorium medewerkers. De EIA is gemakkelijk uit te voeren en te standardizeren. Bovendien kunnen door automatiseren grote aantallen serummonsters snel getest worden. Dit is vooral belangrijk bij epidemiologische onderzoek. Om de specificiteit van de EIA en de IFA te verhogen wordt meestal gebruik gemaakt van gezuiverde, verrijkte en/of geadsorbeerde antigenen. De WB heeft het theoretische voordeel dat antilichamen tegen individuele en specifieke *B. burgdorferi* antigenen aangetoond worden. Door de complexiteit en relatief hoge kosten van een WB test wordt het gebruik enkel aanbevolen ter bevestiging van een positief EIA resultaat. Hierdoor zou de specificiteit verhoogd worden zonder verlies aan sensitiviteit.

De voornaamste problemen met immunologische testen voor LB zijn: het gebrek aan standaardisatie, de heterogeniteit van het genospecies complex *B. burgdorferi* sensu lato en de variabiliteit van het immuun antwoord bij geïnfecteerden. Fout positieve resultaten worden bovendien veroorzaakt doordat testen niet differentiëren tussen acute, chronische en convalescente stadia van de ziekte. Bovendien zijn er veel gezonde personen die een asymptomatische infectie hebben doorgemaakt, maar wel een positieve serumtiter hebben ontwikkeld. Omdat de voorspellende waarde van positieve en negatieve serologische testresultaten sterk afhangt van de kans dat de patiënten LB hebben, is een goede klinische preselectie noodzakelijk. Er moeten dus alleen LB testen worden aangevraagd voor patiënten met duidelijk klinische symptomen van LB en waarbij een *B. burgdorferi* infectie op epidemiologische gronden aannemelijk is; dus van patiënten die door een teek zijn gebeten of uit een endemisch gebied komen en een of meerdere symptomen hebben typisch voor LB.

Door het ontbreken van een duidelijk pathognomonisch kenmerk zoals EM, het diffuse ziektebeeld en de grote hoeveelheid symptomen die met een *B. burgdorferi* infectie worden geassocieerd, is de diagnose van LB bij dieren nog gecompliceerder dan bij de mens. In geval van een *B. burgdorferi* infectie bij de mens kan in een groot percentage van de gevallen de bacterie uit de rand van de huidlaesie met behulp van een biopt geïsoleerd worden. Sera van patiënten met een positieve *B. burgdorferi* kweek, worden in dit geval als de "gouden standaard" beschouwd en gebruikt voor het evalueren van serologische testen voor LB bij de mens. EM komt echter bij dieren niet voor en bovendien is ook bij gezonde dieren de isolatie van

*B. burgdorferi* beschreven. Daarom ontbreekt bij dieren een dergelijke "gouden standaard". Ook seropositiviteit als gevolg van asymptomatisch verlopen infecties lijkt bij dieren meer voor te komen dan bij mensen, wat verklaard kan worden door de grotere kans op tekenbeten. Wel is bij dieren seropositiviteit alleen beschreven in gebieden waar LB endemisch is.

In **hoofdstuk II** is een analyse uitgevoerd van de beschreven prestaties van EIA's en WB's voor de bevestiging van de klinische diagnose van LB bij mensen. In totaal werden 59 artikelen, die verschenen zijn tussen 1990 en 2002 in internationale Engelstalige wetenschappelijke tijdschriften, gerangschikt volgens de kwaliteit van de methodiek waarmee de prestaties van deze testen werden beschreven. Met behulp van een score systeem dat opgebouwd was uit 6 scoregroepen werd rekening gehouden met verschillende factoren zoals: de keuze, samenstelling en aantal positieve en negatieve controle sera, de gebruikte klinische definitie, beschrijving van de testuitvoering, gebruikte antigenen en beschrijving van de evaluatie methodiek. Uit deze systematische evaluatie werd duidelijk dat de keuze en aantallen van de patientengroepen en controle groepen niet overeenstemmen met de daadwerkelijke laboratoriumsituatie. De voornaamste conclusie was dat voor de evaluatie van de prestaties van een test in de klinische situatie naast een aantal sera van klinisch goed gedefinieerde LB patiënten een controle groep bestaande uit sera van niet-Lyme patiënten getest moet worden. Het aantal sera in deze laatste groep dient circa een factor 5 groter te zijn dan het aantal geteste Lyme sera.

In **hoofdstuk III** zijn op klinische microbiologische laboratoria veel gebruikte commercieel verkrijgbare EIA's en WB's voor het testen van sera op de aanwezigheid van antilichamen tegen *B. burgdorferi* onderzocht. De prestaties van 11 EIA's en 4 WB's, die IgM en IgG antilichamen detecteren tegen *B. burgdorferi* werden vergeleken. Hiervoor werd een panel bestaande uit 229 serummonsters gebruikt. Deze sera waren afkomstig van 26 patiënten in het vroege stadium van LB (de vroege LB groep), 13 patiënten in het late stadium van LB (de late LB groep), 62 gezonde vrijwilligers (gezonde controle groep) en een controle groep bestaande uit 128 sera afkomstig van patiënten met ziektebeelden, waarvan de symptomen met die van LB overeenkomen, of die specifieke antilichamen tegen *B. burgdorferi* kunnen hebben (kruisreactie): de niet-Lyme patienten groep. In de vroege LB groep varieerde de sensitiviteit voor alle testen

die IgM antilichamen tegen *B. burgdorferi* detecteren van 35% tot 81%. In de late Lyme groep varieerde de sensitiviteit van 46% tot 92%. In de groep met gezonde vrijwilligers varieerde de specificiteit voor alle testen die IgM en IgG detecteren respectievelijk van 89% tot 100% en van 82% tot 97%. In de controle groep varieerde de specificiteit voor alle IgM en IgG testen respectievelijk van 75% tot 95% en van 84% tot 100%. De testen van Behring (Duitsland) en Genzyme Virotech (Duitsland) gaven de beste resultaten voor wat betreft de detectie van IgM antilichamen tegen *B. burgdorferi* in de vroege LB groep. Ondanks de lagere sensitiviteit voor de detectie van IgG antilichamen tegen *B. burgdorferi* behaalde de Dako (Denemarken) testkit de beste resultaten in de groep patiënten met late LB.

Het gebruik van een EIA-WB twee-stappen protocol verbeterde de specificiteit en de positief voorspellende waarde van het onderzoek. Dit ging echter ten koste van de sensitiviteit, die significant daalde. Epstein-Barr virus of cytomegalovirus infecties veroorzaakten een fout positief resultaat in de IgM-EIA en WB testen. Daarom lijkt bij een positieve IgM-EIA test uitslag, uitsluiting van deze infecties meer relevant dan bevestiging met een WB-test.

De enige polyvalente EIA die geëvalueerd werd gaf beduidend slechtere resultaten dan de geteste monovalente EIA's. Omdat sommige laboratoria het gebruik van polyvalente EIA's prefereren of routinematig altijd een IgM en een IgG EIA gebruiken werden ook de resultaten van de gecombineerde IgM en IgG testresultaten geëvalueerd. Hieruit bleek dat het gebruik van gecombineerde IgM en IgG testen de sensitiviteit weliswaar significant verhoogde, maar door de aanwezigheid van kruisreagerende IgM of IgG antilichamen was de specificiteit significant lager.

In **hoofdstuk IV** worden de resultaten beschreven van een onderzoek naar de prevalentie van IgA, IgM, totaal IgG en subklassen van IgG (IgG<sub>1,4</sub>) antilichamen tegen *B. burgdorferi*. Verder werd onderzocht of met deze informatie de prestaties van de EIA of WB zou kunnen worden verbeterd. Hiervoor werden sera van 40 patiënten met vroege LB, 27 patiënten met late LB, 62 gezonde patiënten en 140 patiënten met andere infecties dan LB gebruikt. In vergelijking met de totale IgG detectie vertoonde IgG<sub>1</sub> een hogere sensitiviteit voor de detectie van antilichamen tegen *B. burgdorferi* antigenen en wel in het bijzonder tegen het 41 kD flagelline eiwit. De prestatie van WB testen werd door de detectie van IgG<sub>1</sub> antilichamen echter niet verbeterd. In het geval van

IgG<sub>1</sub> detectie in met flagelline verrijkte EIA's werd bij patiënten met vroege LB echter wel een verhoging van sensitiviteit en specificiteit waargenomen. Vergeleken met EIA's, die als antigeen een gekweekte *B. burgdorferi* stam gebruiken, was in geval van IgG<sub>1</sub> detectie de sensitiviteit lager dan wanneer IgM of totaal IgG gedetecteerd werd. Bij vroege LB patiënten konden tegen flagelline, in tegenstelling tot andere specifieke antigenen, eerder IgG<sub>1</sub> antilichamen aangetoond worden. Geconcludeerd werd dat de prestaties voor het opsporen van patiënten met vroege LB verbeterd zouden kunnen worden wanneer in met flagelline verrijkte EIA's gebruik gemaakt wordt van IgG<sub>1</sub> detectie.

In hoofdstuk V wordt onderzocht of het bezit van een hond als huisdier of het frequent vertoeven in bos en veld, de kans op een *B. burgdorferi* infectie vergroot. Bovendien werd het verloop van de antilichaam respons bij mens en hond vergeleken. Ook werd de voorspellende waarde onderzocht van de prevalentie van antilichamen tegen *B. burgdorferi* bij honden voor de kans op LB bij mensen in hetzelfde gebied. Hiervoor werden sera van 53 jagers zonder hond, 440 jagers met hun voor de jacht gebruikte hond(en) (n=448) en 75 gezonde stadshonden getest op antilichamen tegen *B. burgdorferi* met behulp van een EIA-test. De seroprevalentie was bij alle groepen vergelijkbaar; bij jachthonden 18%, bij stadshonden 17% en bij jagers 15%. De seropositiviteit bij jachthonden was geen relevante indicator voor een verhoogd risico op LB bij de eigenaar. Omdat bij honden die ouder waren dan 24 maanden de seroprevalentie constant bleef, werd geconcludeerd, dat de persistentie van specifieke antilichamen tegen *B. burgdorferi* na een infectie relatief kort is: circa een jaar. Bij mensen duurt deze seropositiviteit veel langer, maar is zeker niet levenslang. Geconcludeerd werd, dat ondanks een vergelijkbare seroprevalentie, de incidentie van *B. burgdorferi* infecties bij honden aanzienlijk hoger geweest moet zijn dan bij jagers. Er bestond geen correlatie tussen seropositiviteit van een jager en die van zijn/haar hond en daarom lijkt overdracht van (besmette) teken van hond naar mens geen rol van betekenis te spelen in de epidemiologie van LB bij de mens. Hieruit kan geconcludeerd worden dat hondenbezit op zich geen risico vormt voor de mens met betrekking tot LB.

In hoofdstuk VI worden voor de toepassing in sero-epidemiologische studies 5 serologische testen voor de detectie van IgM en IgG antilichamen tegen *B. burgdorferi* sensu stricto bij honden met elkaar vergeleken. Als

antigeen werden in deze testen verschillende genotypen van *B. burgdorferi* gebruikt. Hiervoor werden 1177 sera getest afkomstig van 401 gezonde voor de jacht gebruikte jachthonden, 100 gezonde stadshonden, 47 jachthonden met kreupelheid en 629 stadshonden waarvoor een dierenarts geconsulteerd was vanwege uiteenlopende ziekteverschijnselen. De 5 gebruikte testen waren eerst geijkt en geëvalueerd met sera van experimenteel geïnfecteerde honden en laboratorium honden die nooit met teken in contact konden zijn geweest. De resultaten van de 5 EIA's, waaronder een commerciële testkit (Genzyme-Virotech, Duitsland) kwamen sterk overeen (kappa: 0.78-0.81). Ook de resultaten van een zelf ontwikkelde species onafhankelijke EIA (dit is een EIA die kan gebruikt worden voor het testen van serummonsters van verschillende diersoorten) kwamen goed overeen met die van de 4 andere testen voor het aantonen van IgG tegen *B. burgdorferi* bij honden. Deze zelf ontwikkelde test lijkt daarom bruikbaar voor sero-epidemiologische studies waarbij men sera van verschillende diersoorten wil onderzoeken. Aan de hand van de sera van honden met diverse ziekteverschijnselen zoals: verlamningsverschijnselen (n=60), neurologische afwijkingen (n=60) en huidafwijkingen (n=52) is aangetoond dat de sensitiviteit van de zelf opgezette EIAs onafhankelijk is van de gebruikte *B. burgdorferi* stam. Bovendien bleek uit de resultaten van de sera van experimenteel geïnfecteerde honden dat voor de detectie van acute LB, de indirecte haemagglutinatietest (Diagast®, Frankrijk) een waardevolle test zou kunnen zijn. Met deze test werd een hoge sensitiviteit voor IgM antilichamen aangetoond. Echter noch bij honden met een hoog, noch bij honden met een laag risico op een infectie met *B. burgdorferi* kon een positief serologisch resultaat gecorreleerd worden met klinische symptomen. De ondersteunende waarde aan serologisch onderzoek lijkt daarom voor de diagnose van LB bij honden beperkt. De waargenomen hoge sensitiviteit van de indirecte haemagglutinatietest voor de detectie van IgM antilichamen tegen *B. burgdorferi* bij honden, nodigt uit tot verder onderzoek met deze test bij de mens.

In hoofdstuk VII wordt het regionale risico op LB in Nederland onderzocht door de prevalentie van antilichamen tegen *B. burgdorferi* bij gezonde personen (n=1052), honden (n=1177), runderen (n=3919) en schapen (n=2288) uit 12 verschillende gebieden in Nederland in kaart te brengen. In alle gebieden werden seropositieve mensen en dieren gevonden en bestaat dus het risico op LB. Bij gezonde personen uit de kuststreken

werd een hogere prevalentie (13%-17%) waargenomen dan bij mensen uit het Noorden, Zuiden en Oosten van Nederland (2%-6%). Bij honden werd geen verschil in prevalentie (15%-23%) tussen de diverse gebieden waargenomen. Bij runderen was de hoogste prevalentie (11%-20%) in de oostelijke gebieden en de laagste prevalentie (2%-8%) in de kustgebieden. Bij schapen echter was de prevalentie het hoogst (15%-17%) in de kustgebieden en significant lager (4%-8%) in het Oosten van Nederland ( $P < 0,001$ ). De waargenomen prevalenties verschilden in de diverse onderzochte gebieden en varieerden tussen de onderzochte diersoorten. Dit kon verklaard worden door de geschiktheid van de aanwezige biotopen voor *Ixodes ricinus* teken in de betreffende gebieden en de frequentie waarmee mensen, honden, runderen en schapen uit die gebieden met deze biotopen en dus met teken in contact komen.

## CONCLUSIES

Door het gebrek aan een specifieke antilichaamrespons in sommige LB patiënten, het frequent voorkomen van asymptomatische infecties en aanwezigheid van kruisreagerende antilichamen, kan bij geen enkele serologische LB test een sensitiviteit en specificiteit van 100% bereikt worden. Van alle gebruikte laboratoriumtesten voor serologisch onderzoek van LB bleek de EIA de meest geschikte test te zijn. Deze test moet echter gebruikt worden voor de laboratoriumconfirmatie van een duidelijk klinische verdenking op LB. Het bevestigen van een positief EIA resultaat met een WB-test verhoogde de specificiteit ten koste van de sensitiviteit. Het uitsluiten van een Epstein-Barr virus infectie of CMV infectie bleek effectiever. Daarnaast is de EIA een waardevol hulpmiddel bij epidemiologische studies naar *B. burgdorferi* infecties.

Zoals bewezen bij honden zou voor de detectie van IgM antilichamen bij Lyme patiënten in het vroege stadium van de ziekte, de indirecte haemagglutinatietest van waarde kunnen zijn. Nader onderzoek hiernaar is wenselijk.

Ondanks een hoge prevalentie en incidentie van *B. burgdorferi* infecties bij honden en andere huisdieren in Nederland, lijkt klinische LB bij huisdieren zelden voor te komen.

Bij de mens is het van groot belang dat artsen zich realiseren dat de diagnose LB voornamelijk een klinische diagnose is die gebaseerd is op gegevens uit de anamnese en de klinische symptomen. De diagnose van LB kan enkel door serologisch onderzoek bij patiënten bevestigd worden waarvan de waarschijnlijkheid dat de patient lijdt

aan LB groter is dan 20%. Een lagere waarschijnlijkheid heeft tot gevolg dat laboratoriumbevestiging resulteert in meer foute dan correcte uitslagen.

Bij huisdieren lijkt LB, ondanks de grote besmettingsgraad zelden klinische verschijnselen te veroorzaken.